

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27. 9. 2004

REC'D 11 NOV 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 4 6 2 7 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 4 6 2 7 7]

出 願 人 ソニー株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋

【書類名】 特許願
【整理番号】 0390592302
【提出日】 平成15年10月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
 ソニー株式会社内
 【氏名】 大西 通博
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
 ソニー株式会社内
 【氏名】 安芸 祐一
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
 ソニー株式会社内
 【氏名】 稲垣 稔
【特許出願人】
 【識別番号】 000002185
 【氏名又は名称】 ソニー株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100112874
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 渡邊 薫
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 076005
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0200464

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

液相中での物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように配置された第 1 電極と、を少なくとも備える第 1 基板と、

該第 1 対向電極の対向するように形成された第 2 電極を少なくとも備える第 2 基板と、が重ね合わされたことを特徴とするバイオアッセイ用基板。

【請求項 2】

前記第 1 電極と前記第 2 電極の対向軸が、前記反応領域底面に対して垂直であることを特徴とする請求項 1 記載のバイオアッセイ用基板。

【請求項 3】

前記第 1 電極部位に光源が設けられ、前記第 2 電極部位に受光部が設けられていることを特徴とする請求項 1 記載のバイオアッセイ用基板。

【請求項 4】

前記第 1 電極部位に受光部が設けられ、前記第 2 電極部位に光源が設けられていることを特徴とする請求項 1 記載のバイオアッセイ用基板。

【請求項 5】

物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように設けられた第 1 電極と、を少なくとも備える検出部が設けられた第 1 基板と、

前記第 1 電極との間で前記反応領域に電界印加可能な第 2 電極が少なくとも設けられた第 2 基板と、を用いて、

これら二枚の基板を、前記第 1 電極と前記第 2 電極とが対向するように重ね合わせるバイオアッセイ用基板の製造方法。

【請求項 6】

複数個の前記検出部が配列された前記第 1 基板と、複数個一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第 1 電極との間で対向電極の関係を形成する共通第 2 電極が設けられた前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求項 5 記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

【請求項 7】

複数の前記検出部が基板中央から放射状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つの放射状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求項 5 記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

【請求項 8】

複数の前記検出部が同心円状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つの同心円状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を重ね合わせることを特徴とする請求項 5 記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

【請求項 9】

複数の前記検出部がスパイラル状列をなして配設された円盤状の前記第 1 基板と、一つのスパイラル状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第 2 電極が形成された前記第 2 基板と、を用いることを特徴とする請求項 5 記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

【請求項 10】

前記第 1 電極と前記第 2 電極の対向軸は、前記反応領域底面に対して垂直であることを特徴とする請求項 5 記載のバイオアッセイ用基板の製造方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二枚の基板を重ね合わせてバイオアッセイ用基板を製造する方法及びバイオアッセイ用基板

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAチップその他のバイオアッセイ用基板に係わる技術に関する。より詳しくは、電極を有する二枚の基板を位置合わせして重ね合わせることによって対向電極が形成されたバイオアッセイ用基板並びに該バイオアッセイ用基板の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明に関する主たる背景技術を説明する。まず、第一の背景技術（従来技術）は、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板に関する技術である（例えば、特許文献1、特許文献2参照）。

【0003】

このDNAチップ技術は、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。このためDNAチップは、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等に利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。DNAチップ以外にも、基板上にタンパク質を固定したプロテインチップや種々の物質間の相互作用を解析するためのバイオセンサーチップなども開発されている。

【0004】

第二の背景技術は、液相中において荷電して存在する物質に対する電界の作用に係わる技術である。具体的には、ヌクレオチド鎖（核酸分子）は、液相中において電界の作用を受けると伸長又は移動することが知られており、その原理は、ヌクレオチド鎖の骨格をなすリン酸イオン（陰電荷）とその周辺にある水がイオン化した水素原子（陽電荷）とによってイオン雲を作っていると考えられ、これらの陰電荷及び陽電荷により生じる分極ベクトル（双極子）が、高周波高電圧の印加により全体として一方向を向き、その結果としてヌクレオチド鎖が伸長し、加えて、電気力線が一部に集中する不均一電界が印加された場合、ヌクレオチド鎖は電気力線が集中する部位に向かって移動する（非特許文献1参照）。この移動は「誘電泳動」と呼ばれる。例えば、数十から数百 μm のギャップを持つ微細電極中にDNA溶液をおき、ここに1MV/m、1MHz程度の高周波電界を印加すると、ランダムコイル状で存在するDNAに誘電分極が生じ、その結果、DNA分子は電界と平行に直線状に引き伸ばされる。そして、「誘電泳動」と呼ばれる電気力学的効果によって、分極したDNAは自発的に電極端へと引き寄せられ、電極エッジにその一端を接した形で固定されることが知られている（非特許文献2参照）。

【特許文献1】 特開表4-505763号公報。

【特許文献2】 特表平10-503841号公報。

【非特許文献1】 Seiichi Suzuki, Takeshi Yamanashi, Shin-ichi Tazawa, Osamu Kurosawa and Masao Washizu: "Quantitative analysis on electrostatic orientation of DNA in stationary AC electric field using fluorescence anisotropy", IEEE Transaction on Industrial Applications, Vol. 34, No. 1, P75-83 (1998)。

【非特許文献2】 鷺津正夫、「見ながら行うDNAハンドリング」、可視化情報 Vol. 20 No. 76 (2000年1月)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記したDNAチップ技術は、物質間の相互作用の場を提供する反応領域を基板に予め

設定しておき、この反応領域中にプローブDNA等の検出用ヌクレオチド鎖を固定しておくことによって、この検出用ヌクレオチド鎖と相補的な標的ヌクレオチド鎖との間の相互作用であるハイブリダイゼーションを解析する技術であるが、ハイブリダイゼーションの効率が悪い、同反応に長時間を要する点や、擬陽性や偽陰性の発生するため検出精度が低い点などが重要な技術的課題となっている。

【0006】

このDNAチップ技術を実施する場合において、前記反応領域中にその末端部位が固定されて存在する検出用ヌクレオチド鎖を伸長状態に調整することができれば、ランダムコイル状の分子高次構造に起因する立体障害や前記検出用ヌクレオチド鎖と周辺表面との干渉（例えば、付着や接触）による障害を排除することが可能となり、その結果、ハイブリダイゼーションの効率が向上すると考えられる。

【0007】

そこで、本発明は、反応領域に対向電極を設けておき、これに所定の電界を印加することによって、物質の高次構造調整、移動、固定化等を自在に行うことができるバイオアッセイ用基板の提供並びにその製造方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明で提供するバイオアッセイ用基板の基本構成は、物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように配置された第1電極と、を少なくとも備える「第1基板」と、該第1対向電極の対向するように形成された第2電極を少なくとも備える「第2基板」と、が重ね合わされた形態のものであり、また、第1電極と第2電極の対向軸が反応領域の底面に対して垂直となるものである。

【0009】

そして、第1基板側の第1電極部位に光源を設け、第2基板側の第2電極部位に受光部を設けた構成、あるいは、前記第1電極部位に受光部が設けられ、前記第2電極部位に光源が設けられた構成のバイオアッセイ用基板も提供できる。

【0010】

次に、本発明では、物質間の相互作用の場を提供する反応領域と、該反応領域に臨むように設けられた第1電極と、を少なくとも備える検出部が設けられた「第1基板」と、前記第1電極との間で前記反応領域に電界印加可能な第2電極が少なくとも設けられた「第2基板」と、を用いて、これら二枚の基板を、前記第1電極と前記第2電極とが対向するように重ね合わせるバイオアッセイ用基板の製造方法を提供する。

【0011】

また、複数個の前記検出部が配列された「第1基板」と、複数個一組の前記検出部のそれぞれに配置されている前記第1電極との間で対向電極の関係を形成する共通第2電極が設けられた「第2基板」と、を重ね合わせる製造方法を提供する。この「共通第2電極」は、複数の第1電極との間で対向電極を形成できるので、電極構成を簡易化できる。

【0012】

さらに、円盤状の形態をなす二枚の基板を重ね合わせる場合では、複数の前記検出部が基板中央から放射状列、同心円状列、スパイラル状列のいずれかの形状をなして配設された円盤状の「第1基板」と、一つの前記形状列に属する一部又は全部の検出部にまたがる帯状又は線状の前記共通第2電極が形成された「第2基板」と、を重ね合わせる製造方法も提供する。

【0013】

ここで、本発明で使用する主たる技術用語の定義付けを行う。まず、本発明において用いられる「相互作用」は、物質間の非共有結合、共有結合、水素結合を含む化学的結合あるいは解離を広く意味し、例えば、核酸（ヌクレオチド鎖）間の相補結合であるハイブリダイゼーションを含む。

【0014】

次に、「対向電極」は、電極面が向かい合った状態で配置される少なくとも一対の電極

を意味する。「対向軸」とは、対向する二つの電極面の中心同士を結ぶ直線によって形成される軸を意味する。

【0015】

ここで、本願において「核酸」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖がグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、プローブDNAを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cプローブDNA）、RNA、ポリアミドヌクレオチド誘導体（PNA）等を広く含む。

【0016】

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基配列構造を備えるヌクレオチド鎖間の相補鎖（二本鎖）形成反応を意味する。「ミスハイブリダイゼーション」は、正規ではない前記相補鎖形成反応を意味し、本発明では、しばしば「ミスハイブリ」と略称する。

【0017】

「反応領域」は、ハイブリダイゼーションその他の相互作用の反応場を提供できる領域であり、例えば、液相やゲルなどを貯留できるウエル形状を有する反応場を挙げることができる。この反応領域で行われる相互作用は、本発明の目的や効果に沿う限りにおいて、狭く限定されない。例えば、一本鎖核酸間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用核酸から所望の二本鎖核酸を形成し、該二本鎖核酸とペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることも可能である。例えば、前記二本鎖核酸を用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA部分の結合等を分析することができる。

【0018】

「立体障害（steric hindrance）」は、分子内の反応中心等の近傍に嵩高い置換基の存在や反応分子の姿勢や立体構造（高次構造）によって、反応相手の分子の接近が困難になることによって、所望の反応（本願では、ハイブリダイゼーション）が起こりにくくなる現象を意味する。

【0019】

「誘電泳動」は、電界が一様でない場において、分子が電界の強い方へ駆動する現象であり、交流電圧をかけた場合も、かけた電圧の極性の反転につれて分極の極性も反転するので、直流の場合と同様に駆動効果が得られる（監修・林 輝、「マイクロマシンと材料技術（シーエムシー発行）」、P37～P46・第5章・細胞およびDNAのマニピュレーション参照）。

【0020】

「バイオアッセイ用基板」は、生物化学的、あるいは分子生物学的な分析や解析を目的に使用される情報集積基板を意味し、いわゆるDNAチップを含む。

【発明の効果】

【0021】

本発明によれば、現在普及している確立された光ディスクの製造技術を用いて、対向電極を備えるバイオアッセイ用基板を低コストで、かつ容易に製造することができる。バイオアッセイ用基板の対向電極に所定の電界を所定のタイミングで印加することによって、前記反応領域中に存在する核酸等の物質の高次構造調整、電界に沿って物質の移動、物質の末端部位の電極表面への固定化等を自在に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

以下、本発明に係るバイオアッセイ用基板の製造方法の好適な実施方法及び同バイオアッセイ用基板の好適な実施形態について、添付図面を参照しながら説明する。

【0023】

まず、図1は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板の基本的な製造方法を説明するための図であり、図2は、図1中のI-I線矢視断面図である。これら図1、図2に示された符号1は、本発明に係るバイオアッセイ用基

板を表している。

【0024】

このバイオアッセイ用基板1は、符号11で示す下側の第1基板と、符号12で示す上側の第2基板と、から構成されている。バイオアッセイ用基板1は、これら二枚の基板11と12とを正確に位置合わせして重ね合わせることによって製造される。

【0025】

第1基板11や第2基板12は、ガラスや合成樹脂で形成されており、少なくとも、ハイブリダイゼーションなどの相互作用を検出するために用いる励起光が照射される側の基板は、該励起光の所定波長域で透明な部材で形成するのが望ましい。本実施形態では、第1基板11が透明樹脂で形成されている。

【0026】

下側の第1基板11の所定位置（例えば、中央位置）には、少なくとも一つの検出部Xが設けられている。この検出部Xには、上方に開口する所定容積のウェル（凹部）である反応領域Rと、この反応領域Rの底面中央に配置された、金やアルミニウム等の金属や光透過性のITO（インジウムスズオキサイド）などの導電性材料から形成された第1電極E₁₁と、が設けられている。

【0027】

反応領域Rは、相互作用の場となる溶液を貯留したり、ゲルなどを保持したりできる領域又は空間として機能する。この反応領域Rに設けられた第1電極E₁₁は、第2基板12が第1基板11上に正確に位置合わせされて重ね合わされたときに、前記第2基板12の所定位置に設けられた第2電極E₁₂との間で、反応領域Rの底面に対して垂直方向の対抗軸を備える対向電極を形成する。両電極E₁₁ - E₁₂間に電圧が印加されたときに、反応領域R中の媒質に電界を形成する役割を果たす。なお、対向電極間の距離は、1μm～1mm程度である。

【0028】

また、この第1電極E₁₁は、DNAプローブに代表される検出用物質Dを固定化するための検出表面として機能させることも可能である。この場合において第1電極E₁₁は、予めプローブDNA等の検出用物質Dの末端を固定化できる表面処理を施しておく。なお、前記第2電極E₁₂を固定化の検出表面として用いることも可能である。

【0029】

検出用物質DがプローブDNAである場合を例に挙げると、その固定方法としては、電極E₁₁表面とプローブDNAの末端がカップリング反応等の反応によって固定されるようにしても良い。例えば、ストレプトアビジンによって表面処理された電極表面の場合には、ビオチン化されたプローブDNA末端の固定に適している。あるいは、チオール（SH）基によって表面処理された電極表面の場合には、チオール基が末端に修飾されたプローブDNAをジスルフィド結合（-S-S-結合）により固定することに適している。

【0030】

なお、第1基板11の第1電極E₁₁や第2基板12の第2電極E₁₂の各表面は、SiO₂、SiN、SiOC、SiOF、SiC、TiO₂のいずれか一つから選択される材料によって形成した絶縁層（図示せず。）で覆うことが望ましい（後述する他形態の検出部でも同様。以下説明割愛）。これは、反応領域R中に貯留される場合があるイオン溶液による電気化学的な反応を防止するためである。

【0031】

続いて、図3は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第二の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板の基本的な製造方法を説明するための図であり、図4は、図3中のI-I線矢視断面図である。

【0032】

図3、図4において符号2で示されたバイオアッセイ用基板は、上記したバイオアッセイ用基板1の場合と同様に、二枚の基板が重ね合わされて製造される。即ち、符号21で示された第1基板と符号22で示された第2基板とが重ね合わされることにより製造され

る。

【0033】

このバイオアッセイ用基板2を構成する下側の第1基板21には、計5個（5個に限定しない。）の検出部Xが所定間隔で並設されており、これら各検出部Xの各反応領域Rのそれぞれの底面には第1電極E₂₁が配置されている。一方の第2基板22には、該基板長手方向に延びる線状又は帯状の第2電極E₂₂が設けられている。なお、前記第1電極E₂₁は、図示されたような別個独立の電極とするのではなく、第2電極E₂₂と同様に、線状又は帯状の一体の電極であってもよい。

【0034】

線状又は帯状をなす第2電極E₂₂は、第1基板21の上に第2基板22が重ね合わされたときに、すべての第1電極E₂₁を相手にして対向する共通電極として機能する。即ち、スイッチSをオンにすると、電源Vを介して、各反応領域R中の媒質に対して同時に電界が形成される構成となっている（図4参照）。

【0035】

続いて、図5は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の第三の基本構成を説明する図であって、該バイオアッセイ用基板を構成する円盤状の第1基板の構成を示す図である。図6は、同バイオアッセイ用基板を構成する円盤状の第2基板の構成を示す図である。図7は、第1基板と第2基板が重ね合わされた状態の同バイオアッセイ用基板の断面図である。

【0036】

まず、図5に示す円盤状の第1基板31は、その中心部に円形の孔311が形成されており、かつ該第1基板31の上面には放射状あるいは同心円状をなすように配設された計8列の検出部X群が設けられている。各検出部X（の反応領域R）には、第1電極E₃₁がそれぞれ配置されている。この第1電極E₃₁群は、孔311の周囲に形成されたリング状の第1通電部312に接続状態で導出する配線313に接続されている。なお、第1通電部312は、孔311の周壁面に露出している。

【0037】

図6に示されている、前記第1基板31と同口径の円盤状の第2基板32は、その中心部に前記孔311と同口径の孔321が形成されており、該第2基板32の下面には、放射状をなすように配設された線状又は帯状をなす計8条（8条に限定しない。）の共通電極E₃₂が形成されている。各共通電極E₃₂は、孔321の周囲に形成されたリング状の第2通電部322に接続されている。なお、第2通電部322は、孔321の周壁面に露出している。

【0038】

これらの第1基板31と第2基板32とを正確に所定の位置決めを行い、公知の光ディスク貼り合わせ技術等を応用して重ね合わせし、バイオアッセイ用基板3を形成すると、第2基板32の各共通電極E₃₂は、下側の第1電極E₃₁の各列の真上に、反応領域Rを横断又は縦断するように正確に配置されることになる。これにより各共通電極E₃₂と対向電極を形成する（図7参照）。

【0039】

このとき、第1通電部312と第2通電部322とは一体化し、図7中に符号34で示されたような一つの通電部を形成することになる。この通電部34は、孔35に挿着される通電治具36と接触して通電され、これにより対向電極E₃₂—E₃₂に電圧が印加される。なお、通電の方法はこれに限定されず、対向電極E₃₂—E₃₂に電圧が印加できれば採用可能である。また、前記孔35には、バイオアッセイ用基板3を保持又は回転させるための図示しないチャッキング機構も挿入される。

【0040】

図8は、本発明に係るバイオアッセイ用基板で採用可能な円盤状の第1基板の変形例の構成を示す図である。図示された変形例である第1基板41には、上方視スパイラル状に配列された多数の検出部X群が設けられている。なお、各検出部Xには、符号E₄₁で示

す第1電極が設けられている(図8参照)。

【0041】

第1基板41のような配列構成からなる検出部X群の場合でも、これと同軌道のスパイラル状に延設された共通第2電極を備える第2基板(図示せず。)を重ね合わせたり、あるいは前記検出部X群をスパイラル状で、かつ放射列状に配列しておくことによって、例えば、上記したような第2基板32などを重ね合わせたりすることで、対向電極を形成することができる。

【0042】

図9は、本発明に係るバイオアッセイ用基板に対向電極を形成するために採用できる他の実施形態を示す図である。下側の第1基板には、検出部Xを横断(又は縦断)する給電配線(又は帯状の電極)H₁を延設しておき、一方の上方側の第2基板には、検出部Xを縦断(又は横断)する給電配線(又は帯状の電極)H₂を延設しておくようにする。このような構成では、給電配線(又は帯状の電極)H₁と同H₂が交差する領域Yにおいて、対向電極を簡単に形成することができる。

【0043】

次に、図10は、本発明に係るバイオアッセイ用基板の発展形態の例を説明するための図である。この実施形態を既述したバイオアッセイ用基板1に適用した場合で説明する。

【0044】

まず、対向電極を構成する一方の電極E₁₁又は(電極E₁₂)に微小サイズの光源(例えば、発光ダイオードや半導体レーザー)Pを設け、かつ第1基板11に光源Pと光ファイバで結ばれた導波路構造を設けておき、他方の電極E₁₂(又は電極E₁₁)には、前記光源Pからの出射光により発生した蛍光(例えば、蛍光インターカーレータからの蛍光)を捕捉する受光部である光ディテクターQを一体化して設けておく。

【0045】

この場合、各電極E₁₁又は電極E₁₂は、ITOなどの透明な導電体で形成しておけば、光源(例えば、発光ダイオードや半導体レーザー)Pや光ディテクターQを電極E₁₁、電極E₁₂の内部や反応領域Rに臨んでいない面側に設けることができる。なお、図10の符号Uは、光ディテクターQに接続する解析部を示している。

【0046】

続いて、図11～図13を用いて、本発明に係るバイオアッセイ用基板をDNAチップとして用いる場合のバイオアッセイ方法の一例を説明する。なお、以下の前記方法に係わる説明は、既述した符号1のバイオアッセイ用基板を代表例として採用する。図11は、バイオアッセイ用基板1の要部外観斜視図、図12、図13は、同要部の縦断面図である。

【0047】

(検出用物質Dの伸長及び固定化)

DNAプローブに代表される検出用物質Dを含むサンプル溶液を、開口状態にある反応領域Rに対して、図示しないインクジェットノズルやディスペンサー等を用いて所定容量滴下する。

【0048】

その後、第1基板11に第2基板12を位置決めして正確に重ね合わせた後、スイッチSをオンにし、電源Vを介して、対向電極E₁₁－E₁₂間に高周波交流電界を印加する。なお、この際、対向電極E₁₁－E₁₂の間に印加される前記電界の条件は、約 1×10^6 V/m、約1 MHzの高周波高電圧の電界が好適である(Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990)参照)。

【0049】

なお、反応領域Rに対するサンプル溶液の滴下は、第2基板12の反応領域Rに臨む部分に所定の孔を形成しておき(図示せず)、この孔から滴下するようにしてもよい。このような構成では、サンプル溶液を滴下する場合において、その都度、第2基板12を第1

基板 11 上から取りはずして反応領域 R を開口させる必要がなくなる。

【0050】

ここで、反応領域 R に対して前記高周波交流電界が形成されると、この反応領域 R には、電極 E₁₂ よりも狭小な表面面積に形成された電極 E₁₁ (図 11 参照) の表面付近あるいはこの電極 E₁₁ のエッジ付近に電気力線が集中して、不均一電界が形成される。

【0051】

この不均一電界の作用によって、前記反応領域 R 中にランダムに分散して存在している検出用物質 D である DNA プローブが前記不均一電界に沿った方向に伸長し、直鎖状の高次構造に調製されながら誘電泳動の作用で電極 E₁₁ に向けて移動し、最終的には、検出用物質 D の末端部位が電極 E₁₁ の表面に、特異的なカップリング反応等によって固定化される (図 11 参照)。その後、反応領域 R の所定のバッファー溶液を投入して洗浄作業を行い、余剰の DNA プローブを除去したり、乾燥させたりしてもよい。

【0052】

なお、特に、検出用物質 D が固定化される検出表面として利用する第 1 電極 E₁₁ の表面を、凹凸や突起のある粗面状に加工しておいてもよい。例えば、凹凸が島状になるようにパターンニング形成しておくことによって、電気力線が、第 1 電極 E₁₁ の表面の凸部位 (山状部位) に集中し易くなって、不均一電界がより形成され易くなり、また、DNA プローブ D を整列固定化し易くなる。第 1 電極 E₁₁ の粗面形態は限定されない。また、電極表面を粗面加工する方法は、例えば、公知のスパッタリング技術及びエッチング技術等を用いて実施することができるが、該方法も特に限定されない。

【0053】

(標的物質 T の滴下及び伸長移動)

次に、固定化された前記 DNA プローブ D と相補的な塩基配列を有する標的 DNA (符号 T) を含むサンプル溶液を、第 2 基板 12 が取り外されて再び開口状態とされた反応領域 R に滴下し (又は第 2 基板 12 に設けられた図示しない孔から滴下し)、その後、スイッチ S をオンにし、電源 V を介して、対向電極 E₁₁ - E₁₂ 間に高周波交流電界を印加する。なお、この際、対向電極 E₁₁ - E₁₂ の間に印加される前記電界の条件は、約 1×10^6 V/m、約 1 MHz の高周波高電圧の電界が好適である (Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990) 参照)。

【0054】

この電界印加によって、反応領域 R で生じた不均一電界中において、符号 T で示す標的 DNA を、誘電泳動の電気力学的効果によって、電界強度のより強い電極 E₁₁ の方へ、伸長させながら移動 (泳動) させることができる (図 12 参照)。

【0055】

その結果、符号 D で示すプローブ DNA が予め固定された電極 E₁₁ 表面上に符号 T で示す標的 DNA が集まって濃度が高まり、ハイブリダイゼーションが進行し易い環境が形成され、ハイブリダイゼーション時間を短縮させることができる。

【0056】

加えて、DNA プローブ D を、不均一電界の作用により、第 1 電極 E₁₁ 表面に伸長状態で整列固定化させることができるので、前記検出用物質 D のランダムコイル状の高次構造が原因となる立体障害によるハイブリダイゼーションの阻害やミスハイブリダイゼーションを減少させることが可能となる。このため、ハイブリダイゼーションの効率と精度を向上させることができる。

【0057】

(ハイブリダイゼーション)

ハイブリダイゼーションの際は、一旦スイッチ S をオフにすることによって反応領域 R 中における電界をゼロの状態とし、専ら自然なブラウン運動に委ねて行うようにする。図 13 は、DNA プローブ D と符号 T で示す標的 DNA との間でのハイブリダイゼーション

が進行して、その結果、二本鎖DNAが形成されている状態が模式的に示されている。

【0058】

なお、反応領域Rにおいて、ハイブリダイゼーションによって形成された二本鎖DNAには、予め符号Tで示された標的DNAと一緒に反応領域Rに投入された蛍光インターカーレータ、あるいは、ハイブリダイゼーション後に反応領域Rに投入された蛍光インターカーレータに対して、所定の励起光を照射すると蛍光を発するようになる。この蛍光強度を検出する光学的手段（分光手段）によって、ハイブリダイゼーションを検出することが可能となる。また、前記ハイブリダイゼーションの検出は、検出用物質DであるプローブDNAに標識された蛍光物質が発する蛍光を検出する方法で行うこともできる。なお、本発明において、当該検出手段は特に限定されない。

【産業上の利用可能性】

【0059】

本発明によれば、ハイブリダイゼーション等の相互作用の効率が良いので、該相互作用の時間も大幅に短縮することができ、かつ正確な相互作用が進行し易い環境を形成できるので、擬陽性や偽陰性の発生を少なく抑えることができる。このため、相互作用検出のためのアッセイ作業の効率に優れ、かつ検出精度が高いという特性を備えたDNAチップ等のバイオアッセイ用基板及びその製造方法に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】本発明に係るバイオアッセイ用基板の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板（1）の基本的な製造方法を説明するための図である。

【図2】図1中のI-I線矢視断面図（重ね合わされた状態）である。

【図3】本発明に係るバイオアッセイ用基板の第二の基本構成の一例と該バイオアッセイ用基板（2）の基本的な製造方法を説明するための図である。

【図4】図3中のII-II線矢視断面図（重ね合わされた状態）である。

【図5】本発明に係るバイオアッセイ用基板の第三の基本構成を説明する図であって、該バイオアッセイ用基板（3）を構成する円盤状の第1基板（31）の構成を示す図である。

【図6】同バイオアッセイ用基板（3）を構成する円盤状の第2基板（32）の構成を示す図である。

【図7】第1基板（31）と第2基板（32）とが重ね合わされた状態の同バイオアッセイ用基板（3）の断面図である。

【図8】本発明に係るバイオアッセイ用基板で採用可能な円盤状の第1基板の変形例（41）の構成を示す図である。

【図9】本発明に係るバイオアッセイ用基板に対向電極を形成するとき採用できる他の実施形態を示す図である。

【図10】本発明に係るバイオアッセイ用基板（1）の発展形態の例を説明するための図である。

【図11】バイオアッセイ用基板（1）の要部外観斜視図である。

【図12】同要部の縦断面図であり、標的DNA（T）が電界により伸長されながら移動している様子を模式的に示す図である。

【図13】同要部の縦断面図であり、DNAプローブ（D）と標的DNA（T）との間でのハイブリダイゼーションが進行して二本鎖DNAが形成されている状態を模式的に示している図である。

【符号の説明】

【0061】

1, 2, 3 バイオアッセイ用基板

11, 21, 31, 41 第1基板

12, 22, 32 第2基板

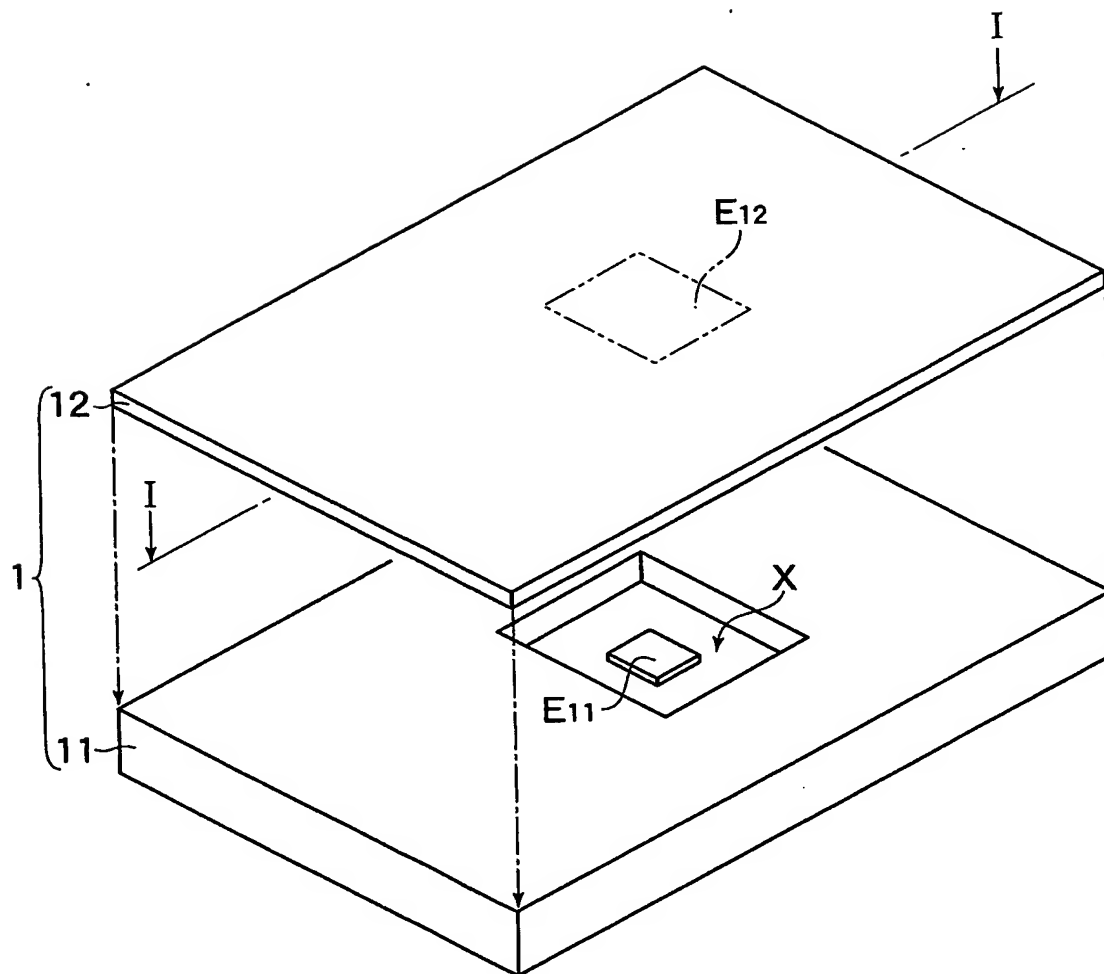
E11, E21, E31, E41 第1電極



- E₁₂, E₂₂, E₃₂ 第2電極
- P 光源 (例、発光ダイオード)
- Q 受光部 (光ディテクター)
- R 反応領域
- X 検出部
- D 検出用物質 (例、DNAプローブ)
- T 標的物質 (例、標的DNA)

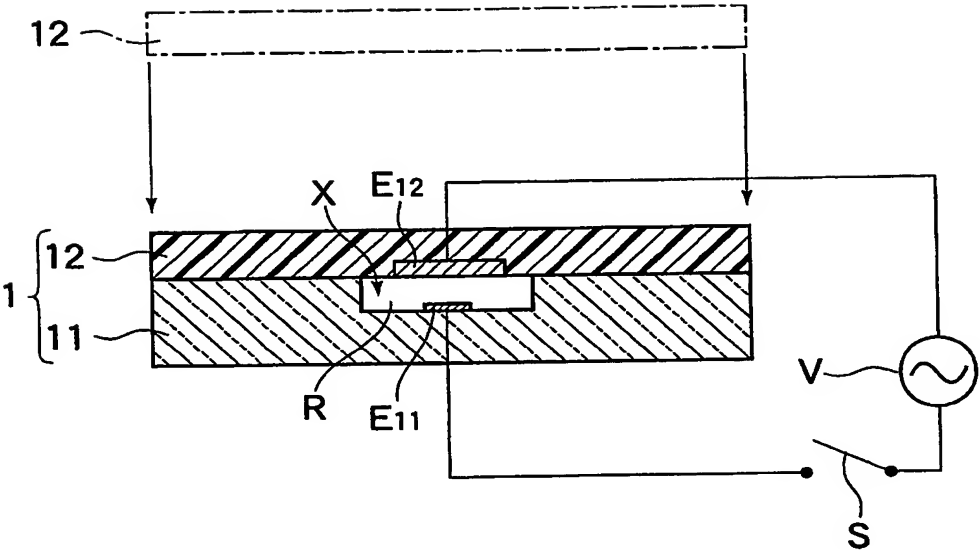
【書類名】図面

【図 1】

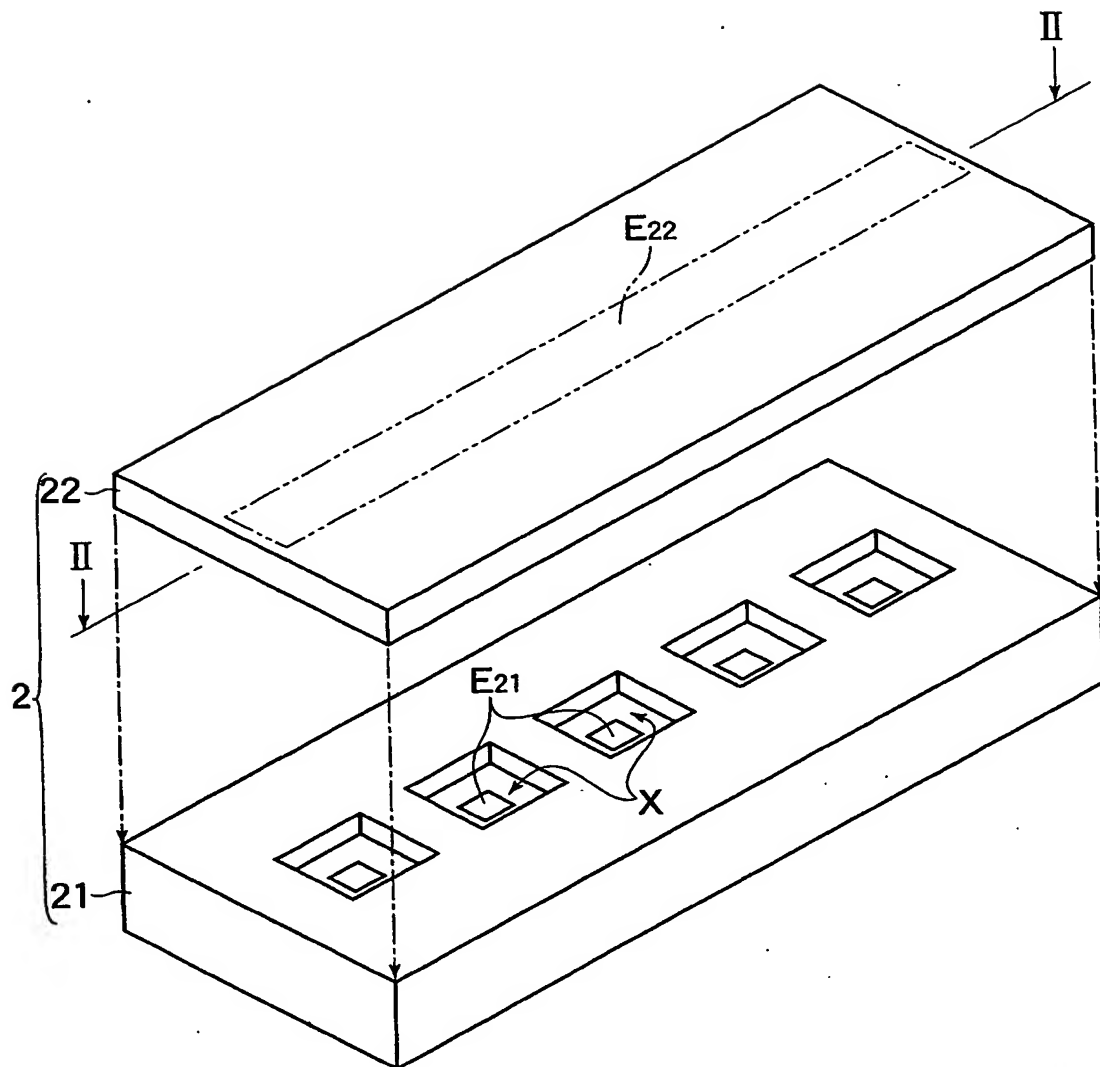




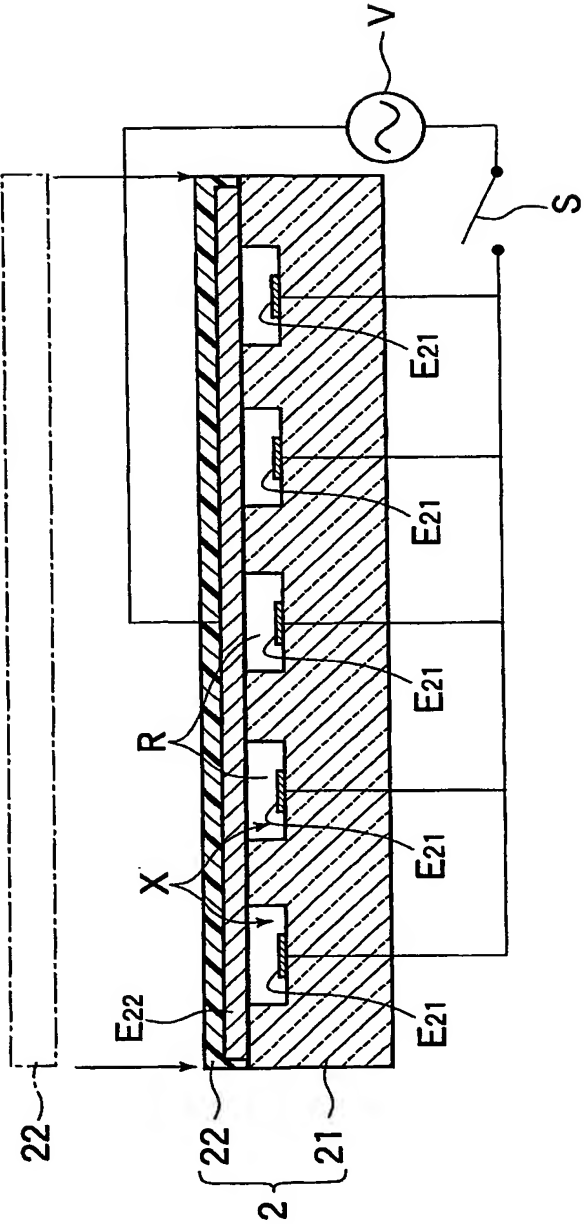
【図 2】



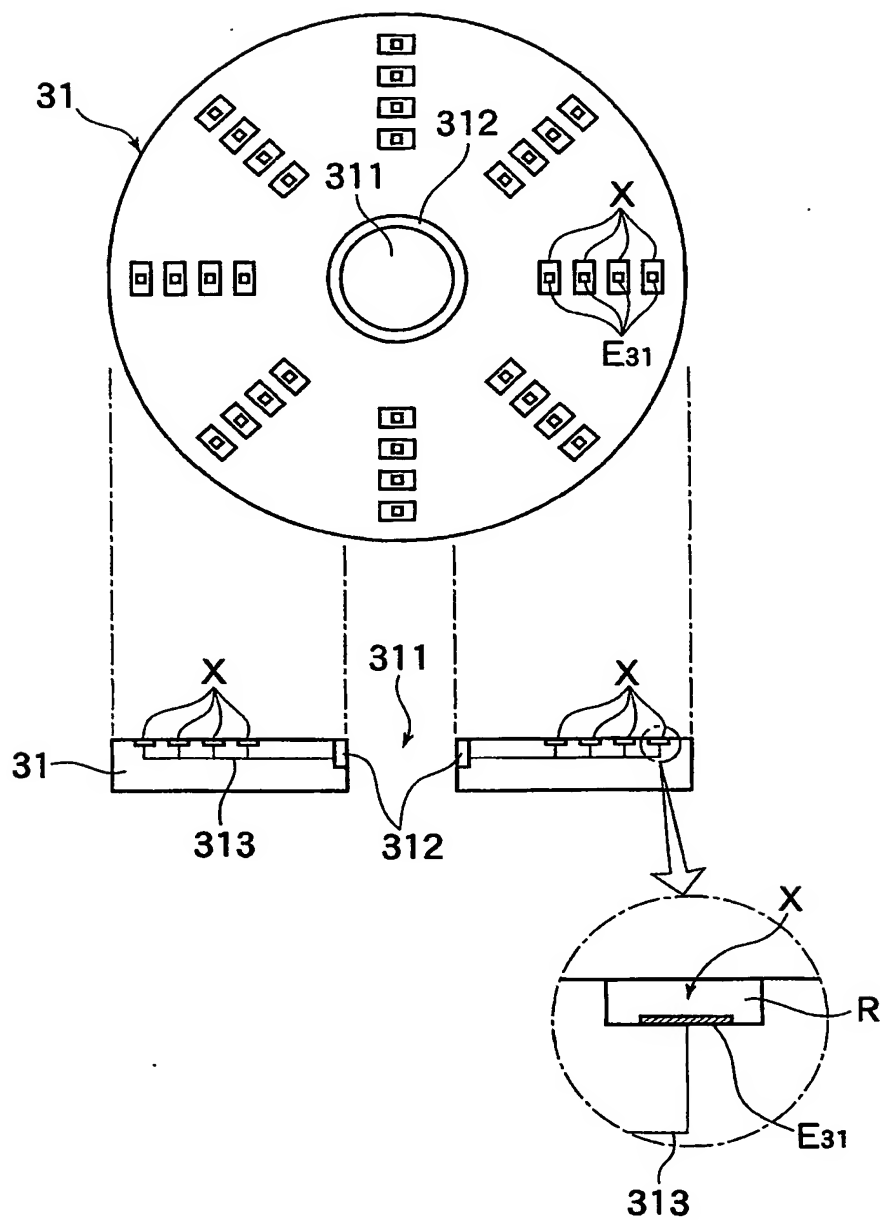
【図 3】



【図 4】

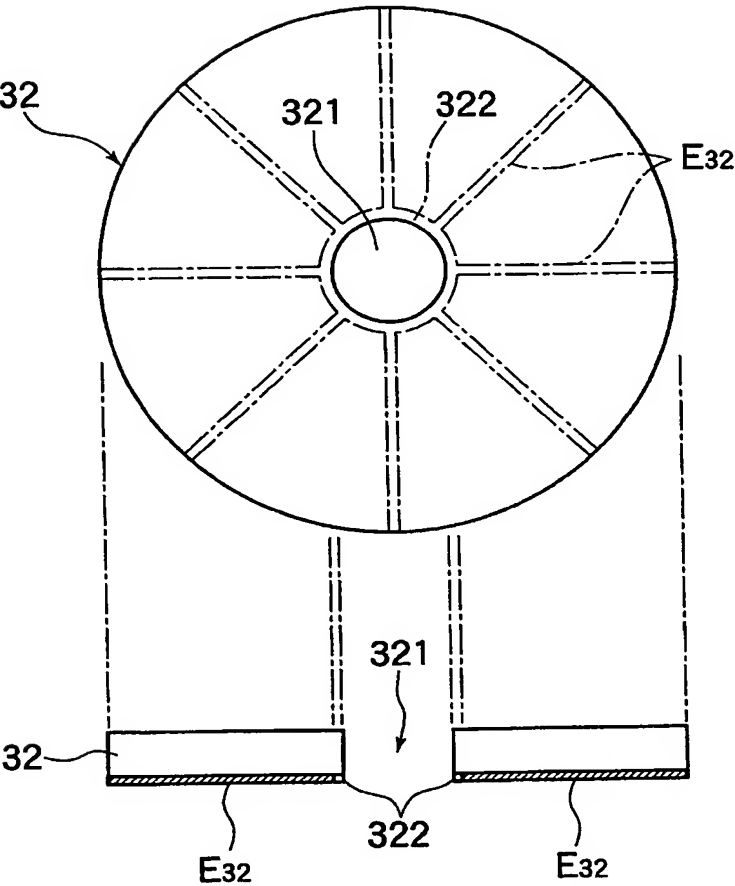


【図 5】



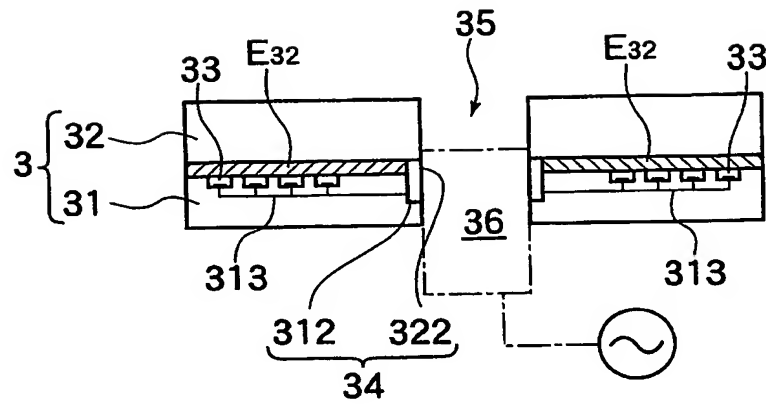


【図 6】

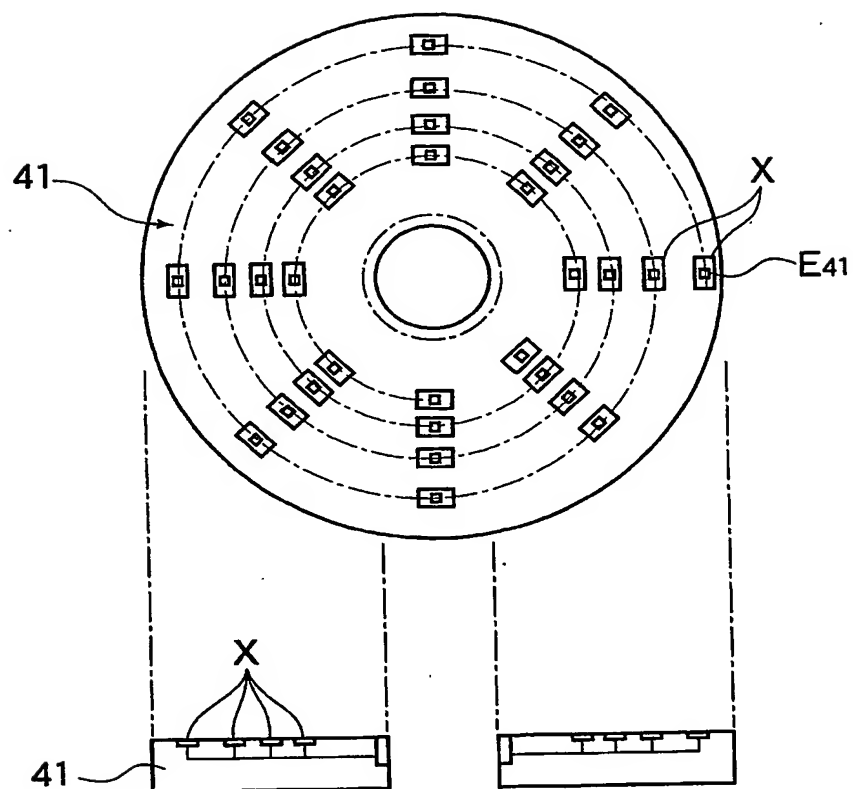




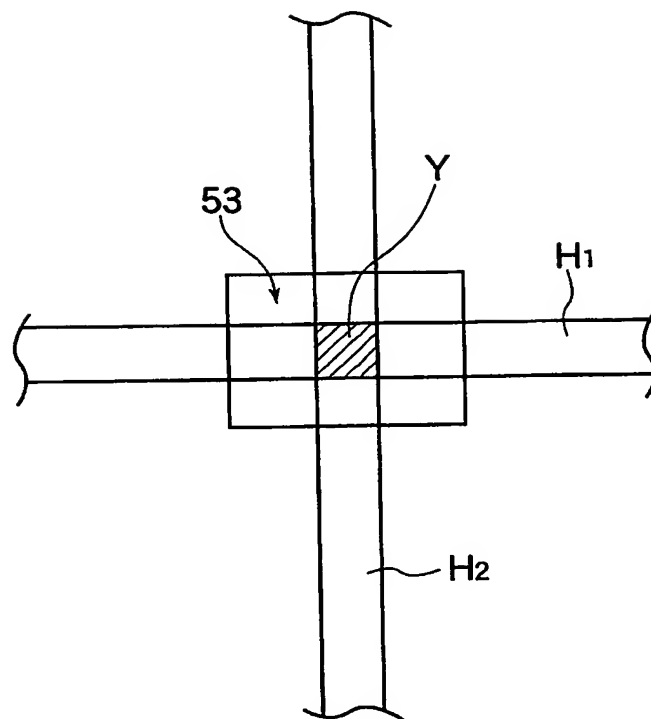
【図 7】



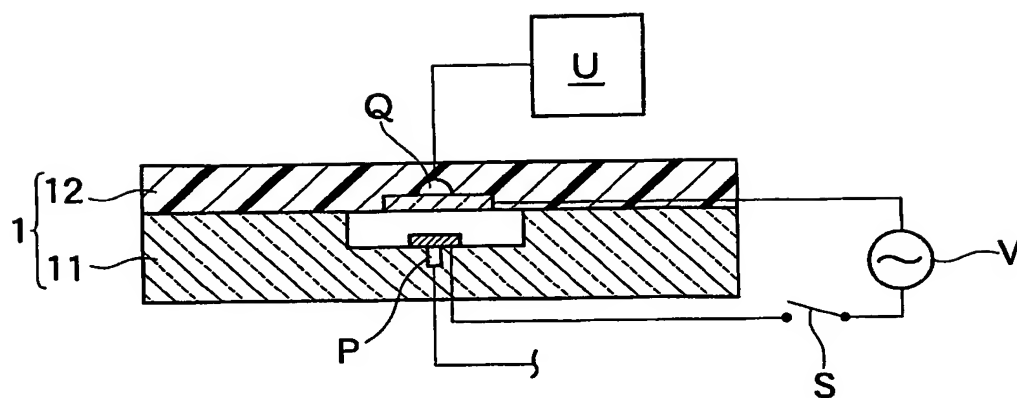
【図 8】



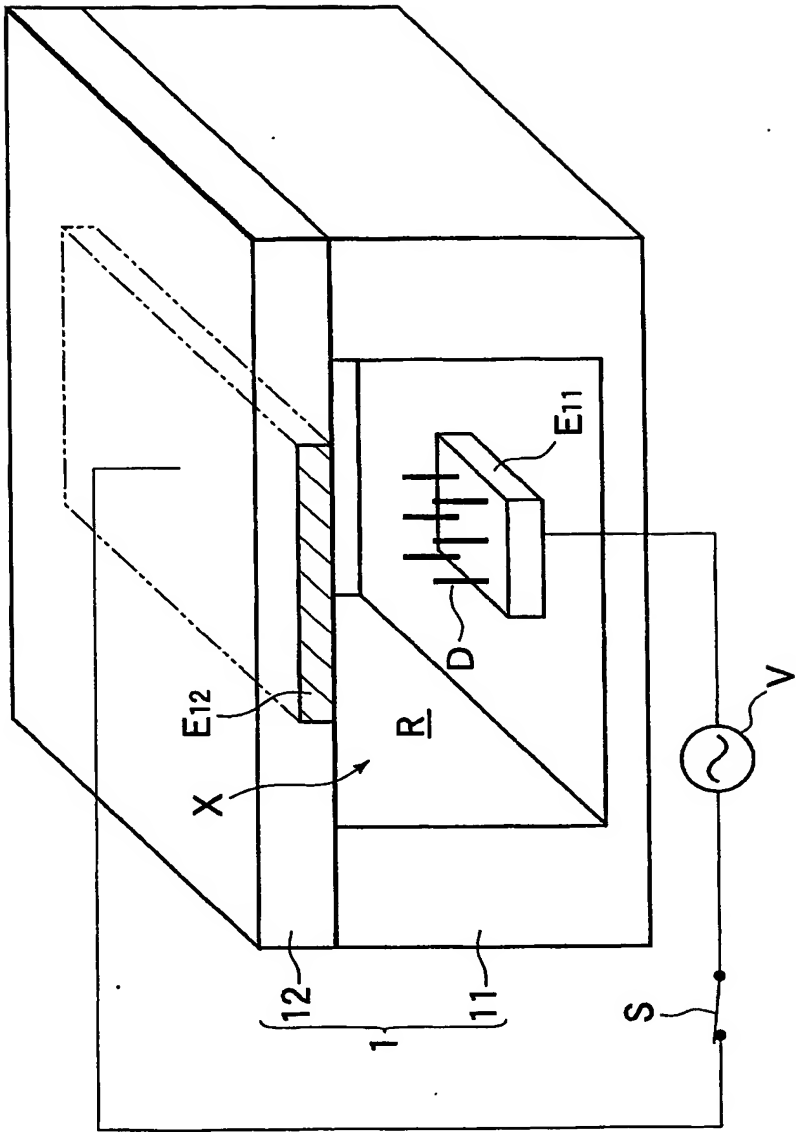
【図 9】



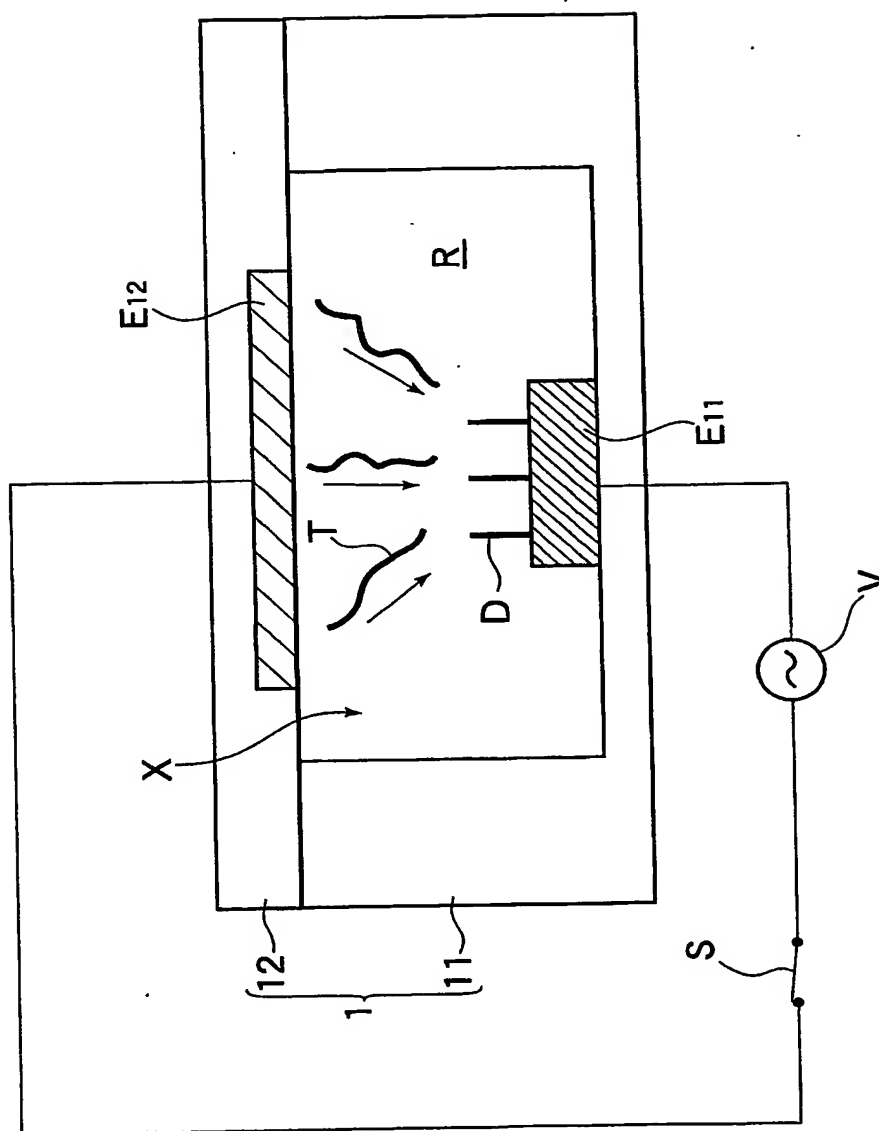
【図 10】



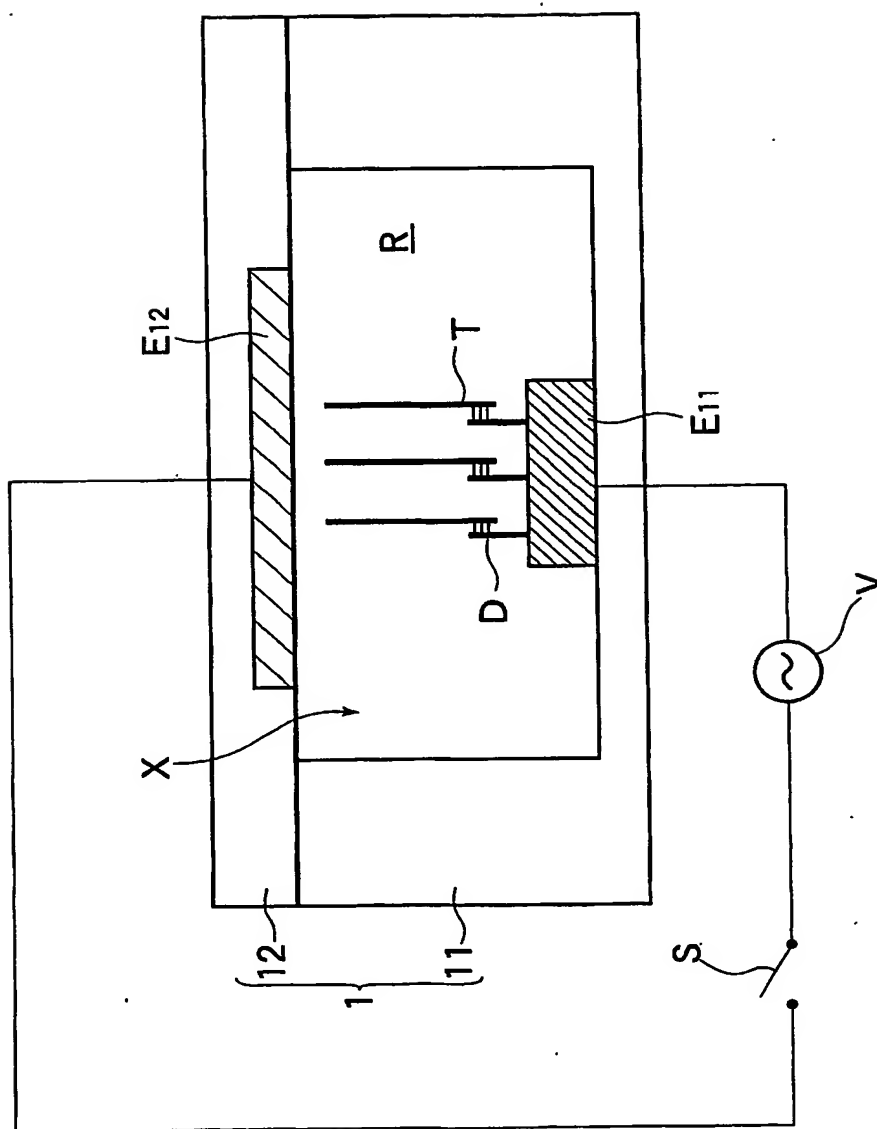
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 反応領域に二対の対向電極を設け、これに所定の電界を印加することによって、物質の高次構造調整、移動、固定化等を自在に行うこと。

【解決手段】 物質間の相互作用の場を提供する反応領域Rと、該反応領域Rに臨むように設けられた第1電極E₁₁と、を少なくとも備える検出部Xが設けられた第1基板11と、前記第1電極E₁₁との間で前記反応領域Rに電界印加可能な第2電極E₁₂が少なくとも設けられた第2基板12と、を用いて、これら二枚の基板11、12を、前記第1電極E₁₁と前記第2電極E₁₂とが対向するように重ね合わせたバイオアッセイ用基板1と該基板1の製造方法を提供する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 3 4 6 2 7 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 1 8 5]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号

氏 名

ソニー株式会社